第 41 卷 第 1 期
1998 年 2 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol. 41, No. 1
Feb., 1998

棉铃虫卵内蛋白酶性质研究*

赵小凡 王金星
（山东大学生命科学院生物系 济南 250100）
王德红
（山东四达科技开发总公司 济南 250014）

摘要 在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 卵母细胞内检测到蛋白酶活性，其作用 pH 在酸性范围，酶活性受 E-64、Pepstatin 和 iPr_2P-F 等多种抑制剂抑制。在 pH4.0时蛋白酶对牛血红蛋白有较高水解率。抗蓖麻蚕 *Philosamia cynthia ricini* 卵半胱氨酸蛋白酶血清和抗蓖麻蚕卵天冬氨酸蛋白酶血清可以识别棉铃虫卵内成分。实验结果表明：棉铃虫卵内可能存在半胱氨酸蛋白酶类、丝氨酸蛋白酶类和天冬氨酸蛋白酶类，并且与蓖麻蚕卵内蛋白酶有一定的相似性。

关键词 棉铃虫，卵内蛋白酶，性质

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 属于鳞翅目夜蛾科昆虫，每年发生4～5代，是严重为害棉花生产的害虫。目前主要采用化学农药防治，由于抗药性发展很快，给防治带来很大困难。杀灭虫卵可以减少抗性发展，减轻为害程度，是理想的防治途径，但目前杀卵剂使用效果不理想，如何发展新型杀卵农药是目前急需研究的课题。

卵内蛋白酶在胚胎发育中水解卵黄蛋白，为胚胎发育提供氨基酸，对胚胎发育具有重要意义。如果能有效抑制卵内蛋白酶活性，胚胎发育必然受阻。研究棉铃虫卵内存在何种蛋白酶、蛋白酶性质、受何种因子抑制、活化及调控等生物化学和分子生物学过程及机理，可以为杀卵农药研制提供理论依据，科学地解释农药的杀卵机理。但由于棉铃虫成虫在取食后卵巢才发育，交配后分批产卵，卵粒很小，胚胎发育时间短，给卵内蛋白酶研究带来很大困难，国内外均未见研究报道。

尽管在其它鳞翅目昆虫中已开展了这方面的研究，但目前结果表明不同昆虫卵内的蛋白酶并不完全相同，如家蚕 *Bombyx mori* 卵内存在半胱氨酸蛋白酶类的组织蛋白酶-L[1]，丝氨酸蛋白酶类[2]；蓖麻蚕 *Philosamia cynthia ricini* 卵内存在半胱氨酸蛋白酶类的组织蛋白酶-B[3]，天冬氨酸蛋白酶类（另文发表）等，而不同的蛋白酶性质又有所不同，因此不能简单地以某种昆虫中的研究结果来概括其它昆虫的情况，必须对多种昆虫进行研究，并比较棉铃虫与这些昆虫卵内蛋白酶的异同，找出共同规律，才能达到预期目标。

本文分析了棉铃虫卵内蛋白酶活性，对蛋白酶进行了鉴定，研究了蛋白酶的作用 pH 及底物，并以多种抗血清对棉铃虫卵内蛋白酶进行了检测。

---

* 国家教委优秀年轻教师基金项目
1995-10-04收稿，1997-05-28收修改稿

1 材料与方法

1.1 材料

昆虫材料：棉铃虫由人工饲料在实验室饲养，羽化后成虫饲以5%蔗糖水，3～5 d后取剖腹卵，以生理盐水洗净备用。

化学试剂：SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂、$TosLysCH_2Cl$、$PhMeSO_2F$ 为Sigma公司产品；E-64为Seikagaku Kogyo（Tokyo，Japan）产品；肽类抑制因子，Iodoacetate和 $TosPheCH_2Cl$ 为Wako Pure Chemical Industries（Osaka，Japan）产品；抗家蚕卵半胱氨酸蛋白酶血清、抗蓖麻蚕卵半胱氨酸蛋白酶血清及抗蓖麻蚕卵天冬氨酸蛋白酶血清、抗蓖麻蚕卵黄磷蛋白血清、抗柞蚕卵黄磷蛋白血清由本实验室制备；牛血红蛋白为上海东风试剂公司产品，其余试剂为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞提取液制备：取生长中、后期的卵母细胞加入少量缓冲液A（0.01 mol/L Tris-HCl，pH 7.0，1 mmol/L 巯基乙醇和1 mmol/L EDTA）于冰浴中匀浆，10 000 r/min 离心10 min，去除脂肪，取上清液以Lowry法测定蛋白质含量，使其最终浓度为2 mg/mL，置−18℃备用。

1.2.2 pH对棉铃虫卵内蛋白酶影响测定：取100 μL卵母细胞提取液，分别加入10 μL、1 mol/L的不同pH的缓冲液调节pH（pH2.0～3.0为甘氨酸-盐酸缓冲液；pH4.0～6.0为醋酸-醋酸钠缓冲液；pH7.0～9.0为Tris-HCl缓冲液），混匀置37℃温育1 h，进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）。

1.2.3 棉铃虫卵内蛋白酶对牛血红蛋白的水解：取0.5 mL 1%的牛血红蛋白（以重蒸水配制），按1.2.2的方法调节pH，加入20 μL卵母细胞提取液，混匀后置37 ℃温育1 h，以3 mL 5%三氯醋酸（TCA）中止反应，以滤纸过滤去除沉淀后测280 nm吸收值，所用仪器为日立UV-240紫外分光光度计。同时作3个重复样品，不同pH均设立对照，取平均值绘制曲线。

1.2.4 不同因子对棉铃虫卵内蛋白酶活力的影响：实验方法同1.2.3（pH3.5），但卵母细胞提取液200 μL先与不同因子混合后，分别平均加入3个重复试样中，根据平均值计算相对活力。

1.2.5 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）：参照Laemmli方法进行[4]。胶浓度为10%，电极缓冲液采用Tris-甘氨酸系统，pH8.6。

1.2.6 双向免疫扩散：参照Ouchterlony方法进行[5]，1.2%琼脂。

2 结果

2.1 不同pH对棉铃虫卵内蛋白酶的影响

棉铃虫卵母细胞匀浆液在不同pH条件下（pH2.0～9.0）温育1 h，经SDS-PAGE分析显示，在pH2.0～4.0条件下卵黄蛋白质大部分被水解，而在pH5.0～9.0条件下卵黄

蛋白水解相对较少，说明卵黄蛋白中存在酸性条件下作用的蛋白酶（图1）。图1中加样量50 μg，0为对照，pH7.0，不温育，其余样品在不同 pH 条件下温育1 h，10%胶浓度，电流40 mA，电压100 V，电泳3 h。

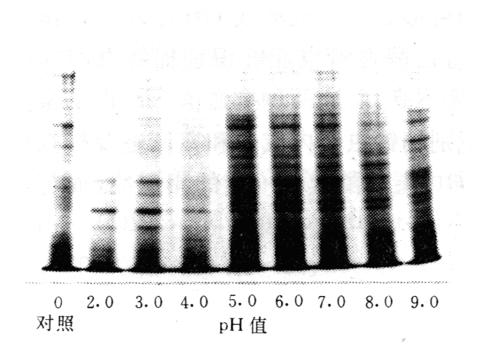
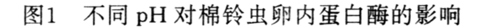



图1　不同 pH 对棉铃虫卵内蛋白酶的影响

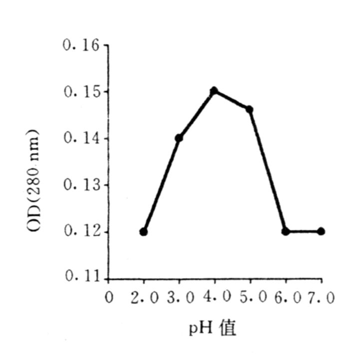


图2　棉铃虫卵内蛋白酶对牛血红蛋白的作用

2.2　棉铃虫卵内蛋白酶对牛血红蛋白的作用

Kageyama and Takahashi（1981，1990）报道了用牛血红蛋白作底物检测家蚕卵半胱氨酸蛋白酶活性的方法，本文参照该方法，测得棉铃虫卵蛋白酶在 pH4.0～5.0时对牛血红蛋白具有较高的水解率（图2），因此用牛血红蛋白来检测棉铃虫卵内蛋白酶活力。

2.3　不同因子对棉铃虫卵内蛋白酶活力的影响

为了确定棉铃虫卵内为何种蛋白酶，我们以多种特异性蛋白酶抑制因子对卵内蛋白酶进行了抑制实验。结果显示：棉铃虫卵内蛋白酶受多种抑制因子抑制，包括半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E-64，丝氨酸蛋白酶抑制剂 iPr_2P-F 和天冬氨酸蛋白酶抑制剂抑胃酶肽(Pepstatin)，但 EDTA、巯基乙醇、N-Ethylmaleimide 不抑制酶活性，亮抑酶肽（Leupeptin）抑制部分活性。因此推测棉铃虫卵内可能存在半胱氨酸蛋白酶类、天冬氨酸蛋白酶类，以及丝氨酸蛋白酶类（表1）。

表1　不同因子对棉铃虫卵内蛋白酶活力的影响

作用因子	浓度 (mmol/L)	相对活力 (%)
空白	-	100
$TosLysCH_2Cl$	0.2	4
$TosPheCH_2Cl$	0.2	30
碘乙酸	0.2	49
N-Ethylmaleimide	0.2	100
2-巯基乙醇	2	100
乙二胺四乙酸	2	107
二异丙基氟磷酸	0.2	33
$PhMeSO_2F$	0.2	33
E-64	0.2	37
Chymostatin	0.1	33
Leupeptin	0.1	86
Pepstatin	0.1	43

注：2%Hb 为底物，pH3.5，卵母细胞提取液200 μL，37℃，3 h

2.4　棉铃虫卵内蛋白酶与家蚕、蓖麻蚕卵内蛋白酶的相似性分析

由于棉铃虫卵难以大量获取，加之卵内

蛋白酶纯化有相当难度，目前为止尚未分离纯化到棉铃虫卵内蛋白酶，对酶的性质不能作进一步研究，如果能从目前研究较多的家蚕、蓖麻蚕或柞蚕 *Antheraea pernyi* 中找出与棉铃虫卵内蛋白酶相似的酶类，则可以间接地了解棉铃虫卵内蛋白酶的性质。因此，我们用多种抗血清探测了棉铃虫卵内蛋白酶。结果显示，抗蓖麻蚕卵黄磷蛋白（Vn）血清和抗柞蚕卵黄磷蛋白血清与棉铃虫卵母细胞提取液均可形成免疫沉淀线（图3：A），抗蓖麻蚕卵半胱氨酸蛋白酶血清和抗蓖麻蚕卵天冬氨酸蛋白酶血清也能够识别棉铃虫卵内成分（图3：B，C），但较弱，其原因可能是相似性程度不高。而这两种抗血清不能识别家蚕卵内成分，抗家蚕卵半胱氨酸蛋白酶血清也不能识别棉铃虫卵内成分和蓖麻蚕及柞蚕卵内成分[6]。该结果表明棉铃虫卵内蛋白酶与蓖麻蚕卵内蛋白酶具有一定的相似性，而与家蚕的差别较大。

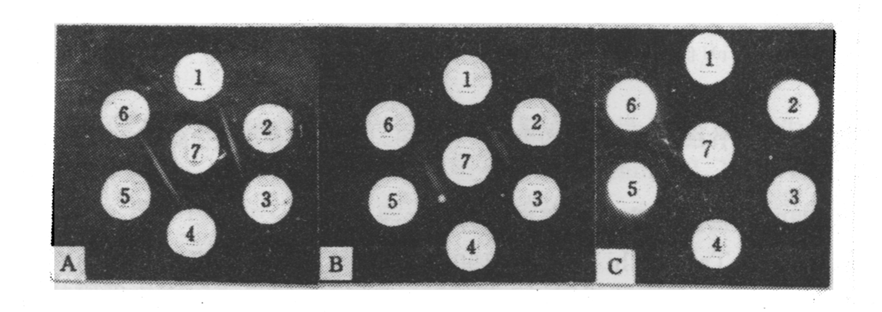


图3 双向免疫扩散（示棉铃虫卵内蛋白酶与蓖麻蚕卵内蛋白酶的相似性）

A：2、5棉铃虫卵母细胞匀浆，7抗柞蚕 Vn 血清；B：2、5棉铃虫卵母细胞匀浆，7 抗蓖麻蚕卵天冬氨酸蛋白酶血清；C：2、5棉铃虫卵母细胞匀浆，7 抗蓖麻蚕卵半胱氨酸蛋白酶血清

3 讨论

根据活性中心的催化基团将内肽酶分为丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶和金属蛋白酶四大类，每一大类又包含许多种不同的蛋白酶，其中半胱氨酸蛋白酶包括组织蛋白酶 B、L、H、N、S、M、T 等[9]。目前已阐明昆虫卵内存在有丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶，家蚕卵半胱氨酸蛋白酶为组织蛋白酶 L 型[1]，而蓖麻蚕和柞蚕的为组织蛋白 B 型[3,7]。由于棉铃虫卵内蛋白酶活性可受多种抑制剂抑制，如半胱氨酸蛋白酶特异性抑制剂 E-64、丝氨酸蛋白酶特异性抑制剂 DFP 和天冬氨酸蛋白酶特异性抑制剂 Pepstatin 抑制，表明棉铃虫卵内可能存在半胱氨酸蛋白酶、丝氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶等多种酶类，但也不能排除一种蛋白酶受多种抑制剂抑制的可能。该抑制实验是以卵母细胞匀浆液进行的，对棉铃虫卵内蛋白酶种类的最终鉴定尚待对蛋白酶的纯化。

棉铃虫卵内蛋白酶的作用 pH 在酸性范围，这与家蚕、蓖麻蚕和柞蚕卵内半胱氨酸蛋白酶的性质相似，从目前结果不难看出，卵生动物卵内蛋白酶作用 pH 一般均在酸性范围。已有实验表明，在胚胎发育中卵黄颗粒会发生酸化，推测是卵黄颗粒膜上的 H^+-ATPase作用的结果[8]。

从免疫扩散结果分析，不同昆虫卵内的半胱氨酸蛋白酶存在免疫学上的差异，如抗

蓖麻蚕卵半胱氨酸蛋白酶血清可以识别棉铃虫卵内蛋白酶，但却不能识别家蚕的。尽管免疫扩散尚不能作为判断卵内蛋白酶异同的最终依据，但在一定程度上反映了不同昆虫卵内蛋白酶的相似性。

关于卵内蛋白酶的活化机制目前尚无有力的证据。家蚕中的研究表明，酸处理可以活化卵内蛋白酶[10]，棉铃虫中是否也如此尚属未知。从理论上讲，卵内应存在有蛋白酶的蛋白质类抑制因子，但目前为止尚无研究报道。外源性蛋白质类抑制因子和其它化学抑制因子亦尚待研究。

文中缩写：E-64，N-[N-(1，3-trans-carboxyoxiran-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine；iPr_2P-F (DFP)，diisopropyl fluorophosphate；$PhMeSO_2F$，phenylmethylsulfonyl fluoride；$TosLysCH_2Cl$，tosyllysine chloromethane；$TosPheCH_2Cl$，tosylphenylalanine chloromethane：Vn，vitellin

参　考　文　献

1 Kageyama T，Takahashi S Y. Purification and characterization of a cysteine proteinase from silkworm，*Bombyx mori*. Eur. J. Biochem.，1990，193：203～210

2 Ikeda M，Sasaki T，Yamashita O. Purification and characterization of protease responsible for vitellin degradation of the silkworm，*Bombyx mori*. Insect Biochem.，1990，20：725～734

3 赵小凡，王金星，王海峰等. 蓖麻蚕卵黄磷蛋白降解酶纯化及性质. 中国动物学会纪念陈桢教授诞辰100周年论文集. 北京：中国科学技术出版社，1994，146～155

4 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature London，1970，227：680～685

5 Ouchterlony O，Nilsson L A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In Immunochemistry，Blackwell，Oxford，1978，1：467～510

6 Zhao Xiaofan，Wang Jinxing. Mechanism of activation and possible role of the cathepsin B-like proteinase and cathepsin D-like proteinase in the eggs of *Philosamia cynthia ricini*. Entomologia Sinica，1996，3 (4)：345～353

7 Zhao Xiaofan，Wang Jinxing，Noriko Y *et al*. Occurrence of a cathepsin B-like acid cystein proteinase in the eggs of silkworm moth，*Antheraea pernyi*. Comp. Biochem. Physiol.，1996，113B：95～103

8 Faggoto F. Yolk degradation in tick eggs：I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. Arch. Insect Biochem. Physiol.，1990，14：217～235

9 Bond J S，Butler P E. Intracellular protease. Ann. Rev. Biochem.，1987，56：334～364

10 Yamamoto Y，Zhao X F，Suzuki A C *et al*. Cysteine proteinase from the eggs of the silkmoth，*Bombyx mori*：site of synthesis and a suggested role in yolk proteins degradation. J. Insect Physiol.，1994，40：447～454

STUDIES ON THE PROPERTIES OF THE EGG PROTEINASES IN *HELICOVERPA ARMIGERA*

Zhao Xiaofan Wang Jinxing
(Department of Biology, Life Sciences College, Shandong University Jinan 250100)
Wang Dehong
(Shandong Star Group Corporation for Science & Technology Development Jinan 250100)

Abstract A proteolytic activity was detected in the developing oocytes of *Helicoverpa armigera*. The optimum pH was in the acidic region. The activity could be inhibited by E-64, pepstatin and iPr_2P-F. A highest hydrolysis rate was detected at pH 4.0 when bovine hemoglobin was used as substrate. The antiserums to the cysteine proteinase and aspartic proteinase of *Philosamia cynthia ricini* could recognize the antigenes in the oocytes of *H. armigera*. The results suggested that there might be cysteine proteinase, serine proteinase and aspartic proteinase in the oocytes of *H. armigera*, and these proteinases are similar to those in *P. cynthia ricini*.

Key words *Helicoverpa armigera*, egg proteinases, properties